

(様式4)

学 位 論 文 の 内 容 の 要 旨

田原 研一 印

BCL6 overexpression alters gene expression profile in a myeloma cell line and is associated with decreased DNA damage response

BCL6の過剰発現は骨髄腫細胞株の遺伝子発現プロファイルを変化させ
DNA損傷応答の減弱と関連する

多発性骨髄腫は形質細胞性腫瘍の1つであり、ゲノム異常の蓄積が発症、進行に関与していると考えられているが、その背景にあるゲノム不安定性をもたらす分子機構はほとんど解明されていない。胚中心B細胞では、BCL6がATRやp53、p21などのDNA損傷応答(DDR) 遺伝子の転写を抑制することで、抗原親和性の高い抗体の産生を可能にするためゲノム不安定性の増加する中で細胞の生存・増殖を担保していると考えられている。通常、形質細胞への分化に伴いBCL6の発現は抑制されるが、多発性骨髄腫ではBCL6が異所性に高発現していることが最近報告された。しかし、骨髄腫細胞におけるBCL6の役割はほとんど解明されていない。本研究では多発性骨髄腫におけるBCL6の役割、特に多発性骨髄腫におけるDDRやゲノム不安定性にBCL6が与える影響を検討した。

はじめに、7種類の多発性骨髄腫の細胞株におけるBCL6の発現量をRT-qPCRにより測定した。BCL6陽性のリンパ腫細胞株(CTB-1)と比較し骨髄腫細胞株では低発現であった。そこで、これらの細胞株の中のKMS12PEに対してレトロウイルスを用いてBCL6を導入し、BCL6発現株(KMS-12PE-BCL6)を樹立した。この細胞株のBCL6の発現量はCTB-1と同程度であった。さらにWestern blot法やフローサイトメトリー法により蛋白レベルでのBCL6の発現を確認した。この細胞株を用いて、以下の実験を行った。まず、DDR遺伝子であるATRやp53、p21の発現量を測定した。コントロールと比較し、KMS12PE-BCL6細胞での転写抑制は認めなかった。さらに、抗BCL6抗体を用いたChIPアッセイにより、BCL6がこれらDDR遺伝子の転写調節領域に結合していることが明らかになった。この細胞株をBCL6の転写抑制因子結合部位であるBTBドメインに対する阻害剤に暴露しても転写レベルが上昇しなかったことから、KMS12PE細胞では BCL6はこれらの領域に結合しているものの、転写抑制には働いていないと考えられた。

次に、DNA損傷応答におけるBCL6の役割を検討するため、KMS12PE-BCL6をX線照射および抗がん剤エトポシドに暴露し、実験を行った。X線照射およびエトポシドによりDNAに二重鎖切断が生じると、DNA損傷センサー蛋白の一つであるataxia telangiectasia mutated (ATM)がDNA損傷周囲のヒストンH2AXをリン酸化(γ H2AX)する。 γ H2AXは核内で点状(γ H2AX foci)に形成され、損傷部に修復蛋白を動員する。KMS12PE-BCL6およびコントロール細胞を用いて、DNA損傷下での γ H2AX foci形成を蛍光免疫染色およびフローサイトメトリー法で評価した結果、BCL6の過剰発現により γ H2AX foci形成が抑制されたことから、BCL6はDNA損傷時にDDRを抑制することが示唆された。ATMの蛋白発現およびそのリン酸化をWestern blot法で評価すると、

X線照射によるDNA損傷下では、KMS12PE-BCL6ではATMの総蛋白量およびリン酸化蛋白量が減少することが明らかになった。BCL6の導入によりATMの転写も抑制されることを確認した。また、KMS12PE-BCL6にBTBドメイン阻害剤を作用させてもATMの転写に変化を認めなかった。これらの結果から、KMS12PE-BCL6においてはBCL6によるATMの転写抑制を介してDDRが抑制されること、その機序はBTBドメインを介した転写抑制とは別の機序であることが示唆された。

さらに、骨髓腫細胞株におけるBCL6の役割を網羅的に解析する目的で、KMS12PE-BCL6より抽出したRNAを用いて全mRNAシーケンスを行った。その結果、BCL6の導入により形質細胞から胚中心B細胞への脱分化を示唆する遺伝子発現プロファイルの変化を認め、さらにその中で、AIDの発現が亢進することを発見した。AIDは胚中心B細胞に発現し、免疫グロブリン遺伝子に高頻度体細胞突然変異とクラススイッチを起こし、液性免疫の多様性獲得に必須の蛋白であるが、近年、癌遺伝子に変異を引き起こすことで発癌との関連が報告されている。BCL6によるAIDの発現亢進は骨髓腫細胞のゲノム安定性を脅かす可能性が考えられた。

また、KMS12PEをIL-6で刺激すると、過去の報告と同様にBCL6の発現が亢進することが確認された。さらに今回、ATMの転写抑制、 γ H2AX foci形成の抑制、AIDの転写亢進というBCL6を過剰発現した時と同様の変化が起きることが明らかとなった。

以上より、骨髓腫細胞株においてBCL6の過剰発現はATMの転写抑制によりDNA損傷応答を抑制し、B細胞への脱分化によるAIDの発現亢進をもたらした。また、IL-6による刺激によってBCL6の強制発現と同様の結果をもたらしたことから、細胞外からのシグナルがBCL6を介して骨髓腫細胞のゲノム安定性に負の影響を与えている可能性が考えられた。